

TECHNIQUES D'ÉTUDE DU POLLEN AU MEB : MÉTHODE SIMPLE DE COUPES

par M. HIDEUX et L. MARCEAU

RÉSUMÉ : Une technique simple de coupes de grains de pollen, après inclusion dans une solution de gomme arabique-glycérine, est donnée, comme une alternative ou un complément de la technique d'obtention de surfaces de rupture de l'exine par les ultrasons, pour les observations au microscope électronique à balayage (MEB).

SUMMARY: A simple technique for sectioning pollen grains after embedding in a solution of gum-arabic and glycerin, is described, as a complementary or alternative technique to ultrasonic splitting of the exine, for study by scanning electron microscopy.

Cette note fait suite à un article publié récemment où les effets des différents traitements physico-chimiques sur le pollen avaient été comparés (HIDEUX, 1972 a). La présente technique avait été brièvement présentée, toutefois des résultats expérimentaux complets n'avaient pu être donnés.

DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE

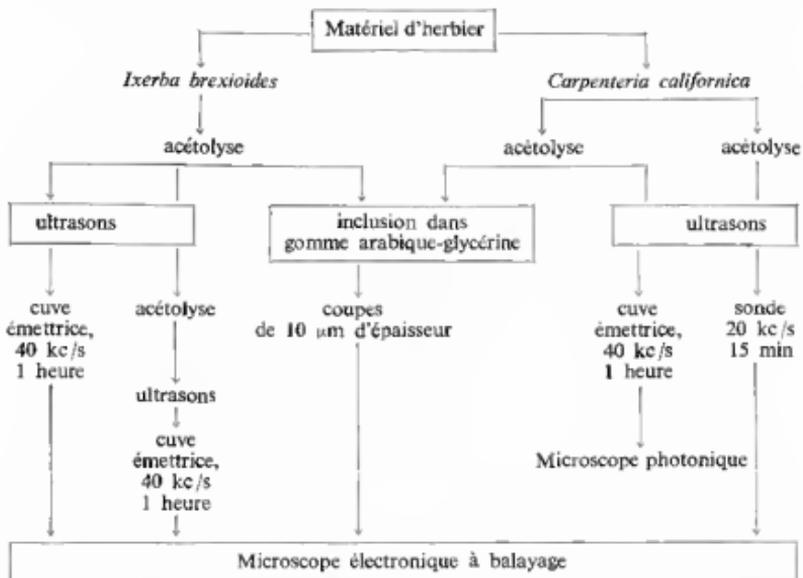
Le milieu d'inclusion, constitué par une solution de gomme arabique et de glycérine, est préparé selon la technique de LEINS (1968). Les proportions initiales sont les suivantes : eau, 6 ml (25 %); glycérine, 4,5 ml (25 %); gomme arabique, 11 g (50 %) et quelques cristaux de phénol. La solution peut être soit préparée directement à ces proportions en facilitant le dégazage par un procédé physique, soit préparée en doublant la quantité d'eau et en la faisant évaporer ensuite pour revenir à 25 %. La solution préparée peut se conserver pendant plusieurs mois à l'abri de l'air.

On dépose, à l'aide d'un agitateur en verre, la quantité nécessaire¹ de ce milieu d'inclusion à la base d'un support cylindrique en bois dont le diamètre est de l'ordre de 8 mm. Le pollen ayant subi une acétolyse de durée appropriée, est rincé à l'acide acétique plusieurs fois, puis à l'eau (HIDEUX, 1972 a) et enfin dans une solution claire de gomme arabique-

1. Quantité nécessaire pour former une grosse « goutte » couvrant totalement la base du support dont le diamètre est de 8 mm.

glycérine¹. Il est ensuite transféré à l'aide d'une pipette Pasteur, sur la « goutte » du milieu d'inclusion où sa pénétration, effectuée au moyen d'un fil de verre très fin étiré à la flamme, est contrôlée sous la loupe binoculaire. Le séchage rapide du milieu d'inclusion à l'étuve à 70 °C est déconseillé : les bulles formées lors de l'inclusion ne s'éliminent pas. Par contre, elles disparaissent lors d'un séchage lent d'environ 8 jours à l'abri de l'humidité de l'air ambiant. Lorsque la « goutte » a atteint la dureté convenable, c'est-à-dire lorsque qu'elle est encore rayable à l'ongle (LEINS, 1968), on peut aisément la tailler en tronc de pyramide selon la technique couramment utilisée pour les blocs d'inclusion en microscopie électronique à transmission. Les coupes sont réalisées sur un microtome de marque SPENCER équipé d'un support spécial pour recevoir des couteaux de verre semblables à ceux utilisés en ultramicrotomie. L'épaisseur des coupes est variable selon la dimension des grains de pollen; elle est choisie de façon à avoir une forte probabilité de couper le grain de pollen en deux fragments. Cette probabilité est réalisée pour des coupes de l'ordre de $P/2^2 \mu\text{m}$ pour les pollens longiaxes et de l'ordre de $E/2^2 \mu\text{m}$ pour les pollens bréviaxes.

TABLEAU 1. — SCHÉMA EXPÉRIMENTAL DES TRAITEMENTS PHYSICO-CIMIQUES



1. Solution claire de gomme arabique-glycérine = dilution d'une goutte de solution initiale dans une grande quantité d'eau distillée (environ 10 ml).

2. P = dimension de l'axe polaire en μm ; E = dimension du diamètre équatorial en μm .

L'expérience montre que le degré de liberté, autour de cette dimension préférentielle, est assez grand. Dans l'expérience décrite ici dans le tableau 1, où des grains de pollen de $P = 17 \mu\text{m}$ et de $P = 35 \mu\text{m}$ sont simultanément coupés dans le même bloc, la dimension moyenne de $10 \mu\text{m}$ a été retenue comme épaisseur des coupes. Les premiers grains de pollen sont normalement coupés en deux fragments. Les seconds le sont aussi souvent en raison de leur état, fortement collapsé après l'acétolyse, qui réduit très sensiblement leurs dimensions. Les coupes obtenues, plongées dans l'eau pour solubiliser le milieu d'inclusion, sont recueillies après centrifugation et transférées, selon la technique habituelle (CERCEAU et al., 1970; HIDEUX, 1971 et HIDEUX, 1972 a), sur une lamelle de verre de 12 mm de diamètre.

RÉSULTATS

L'application de cette technique de coupes, après inclusion dans une substance hydrosoluble, est particulièrement intéressante pour les grains de pollen résistant à la rupture par les ultrasons et pour ceux dont l'exine fragile et souple se replie sur elle-même après rupture (HIDEUX, 1972 a).

Les deux espèces, choisies parmi les Saxifragacées ligneuses, *Carpenteria californica* Torr. et *Ixerba brexioides* A. Cunn., illustrent précisément ces deux cas d'obtention difficile de surfaces de rupture après un traitement par les ultrasons. Le premier à cause de la dimension réduite et de la forme subsphérique des pollens (résistance à la rupture), le second à cause de la fragilité de l'exine (pollens collapsés dès l'acétolyse).

Ixerba brexioides A. Cunn.¹

CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES DU POLLEN EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE

Symétrie, forme et dimensions: Pollen à symétrie d'ordre 4 ou 5, ovale en coupe optique méridienne ($P = 34 \mu\text{m}$; $E = 30,5 \mu\text{m}$), longiaxe ($P/E = 1,13$), zone interaperturale très convexe et angle apertural obtus en coupe optique équatoriale.

Exine: Exine épaisse à tectum lui-même très épais et perforé (?).

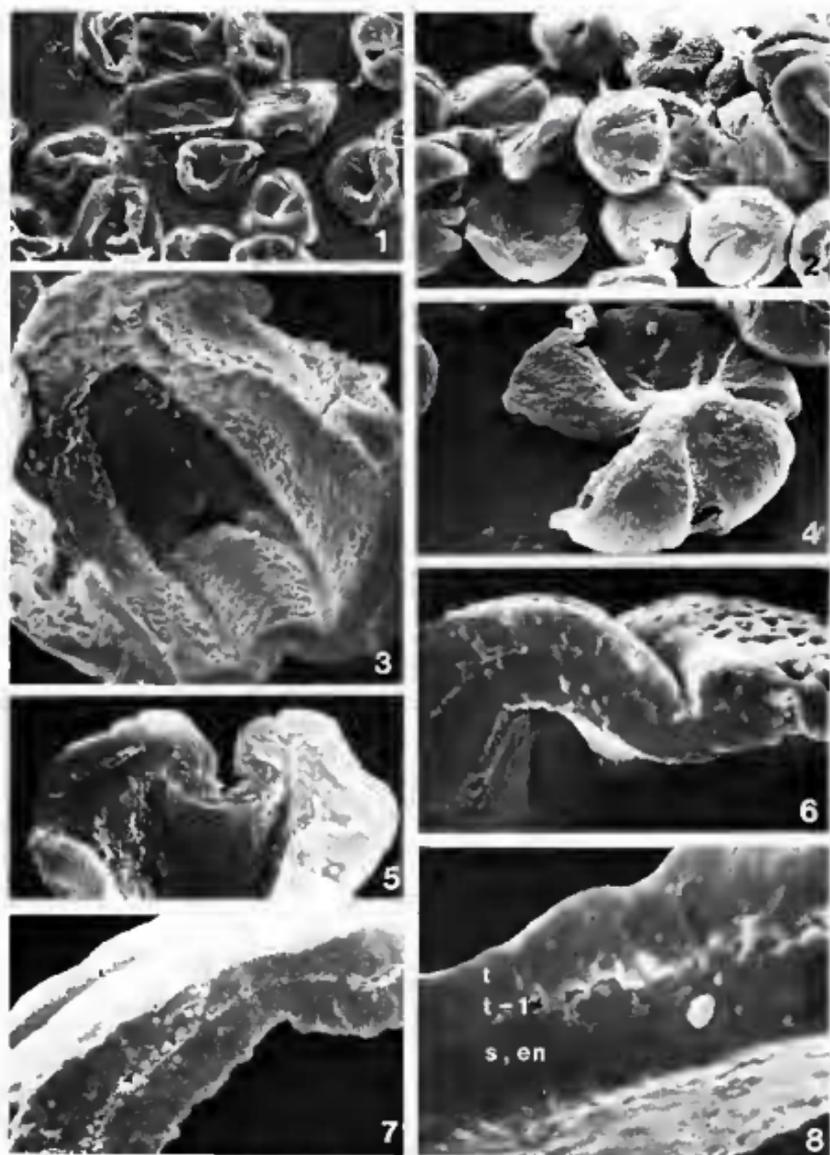
Apertures: Pollen quadricolporé ou pentacolporé. Système apertural composé. Ectoaperture-sillon méridien; endoaperture équatoriale de forme invisible dissimulée par un pli apertural, associé à l'ectoaperture, très important; épaississement médian prononcé de l'endexine sous l'ectoaperture; amincissements latéraux méridiens de l'endexine type *Brexia* (HIDEUX, 1972 b, c).

OBSERVATIONS STRUCTURALES AU MEB

1° *Traitement habituel*: Après une acétolyse et un traitement par les ultrasons (cuve émettrice², 1 h, 40 kc/s), de très nombreux grains de pollen sont collapsés (Pl. 1; fig. 1) et les surfaces de rupture sont pratique-

1. *Ixerba brexioides*, sous-famille des Brexioidées, tribu des Brexiées, Nouvelle-Zélande. Matériel pollinique prélevé grâce à l'obligeance du Dr FERGUSON (K): 1) *Collenso s.n.* (1843), New Zealand (K); 2) *T.F. Cheeseman s.n.*, New Zealand (K.).

2. Appareil provenant de la Société Piézo-Céram (réf. 16 G) consistant en trois bases émettrices en titanate de baryum vibrant respectivement à 40 kc/s, 500 kc/s et 1 000 kc/s dans des cuves remplies d'eau transductrice.



Pl. 1. — *Ixerba bresioides* A. Cunn. : 1, simple traitement physico-chimique (acétolyse + ultrasons); 2, 4, double traitement; 3, 5-8, coupes après inclusion dans gomme arabique-glycérine. — 1, pollens entiers collapés $\times 600$; 2, pollens entiers, quelques-uns sont collapés; 3, surface interne de l'endexine et du système apertural, pli apertural, amincissements latéraux méridiens de l'endexine, endoaperture. Granulations de l'endexine s'estompant au niveau médian du syst. apert. $\times 3\,000$; 4, surface de rupture longitudinale par rapport à l'ectoaperture-sillon $\times 1\,200$; 5, coupe transversale du syst. apert. Pli apertural très prononcé $\times 3\,000$; 6, idem, avec surface externe perforée du tectum $\times 6\,000$; 7, coupe de l'exine. Tectum très épais : *t*, columelles minuscules : *t-1*, sole-endexine : *s, en*, épaisse (*t/s + en* $\neq 1$) $\times 6\,000$; 8, idem. $\times 12\,000$. (La réduction photographique, par rapport aux observations originales sur l'écran du M.E.B. est de 40 %). — Clichés des Laboratoires d'Écologie et de Géologie du Muséum.)

ment inexistantes. Une seconde acétolyse et un second traitement par les ultrasons (dans les mêmes conditions que le premier) permettent l'observation de rares surfaces de rupture souvent longitudinales au niveau de l'ectoaperture-sillon et repliées sur elles-mêmes.

2° *Inclusion dans la gomme arabique-glycérine* : Les sections de grains de pollen acétolysés révèlent des plans de coupe nombreux et variés de l'exine (Pl. 1; fig. 5-8), des surfaces internes de l'exine et des apertures (Pl. 1; fig. 3). Les coupes de l'exine confirment l'épaisseur très importante du tectum et révèlent l'épaisseur des autres sous-couches de l'exine : tectum perforé très épais (t); columelles punctiformes (t-1), sole-endexine épaisse (s + en). La valeur du rapport $t/s + en$, défini pour l'étude structurale de l'exine au MEB (HIDEUX, 1972 b, c), est très voisine de l'unité (Pl. 1; fig. 6-8). Le caractère granuleux de la surface interne de l'endexine, la forte amplitude du pli apertural, la présence d'amincissements latéraux méridiens qui entourent complètement le système apertural¹, la forme de l'endoaperture sont mis en évidence par l'examen de la surface interne de l'endexine obtenue par la coupe longitudinale du grain de pollen (Pl. 1; fig. 3). Le pli apertural et les amincissements latéraux de l'endexine sont également particulièrement nets sur une coupe transversale du système apertural (Pl. 1; fig. 5). L'amincissement de l'ectexine affecte essentiellement le tectum au niveau de l'ectoaperture où des éléments sculpturaux, équivalents morphologiques réduits des columelles des zones interaperturales, sont visibles (Pl. 1; fig. 6).

Carpenteria californica Torr. ².

CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES DU POLLEN EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE

Symétrie, forme et dimensions : Pollen à symétrie d'ordre 2 ou 3, ovale ou sphérique en coupe optique méridienne (P = 15-17 μm ; E = 15-17 μm), subéquiaxe (P/E \neq 1), zone interaperturale convexe et angle apertural obtus en coupe optique équatoriale.

Exine : Tectum partiel, réseau.

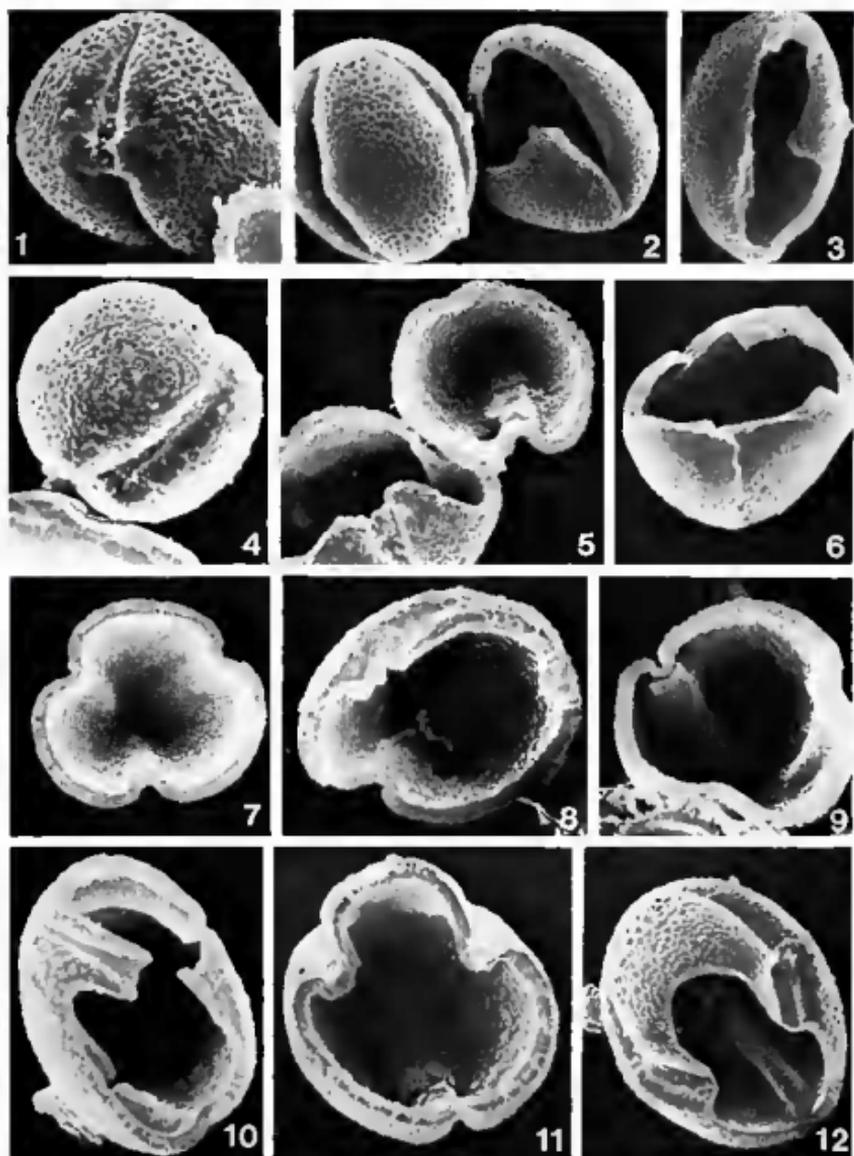
Apertures : Pollen tricolporé. Système apertural composé. Ectoaperture-sillon méridien; endoaperture équatoriale visible de profil en coupe optique méridienne. Pli apertural associé à l'ectoaperture.

OBSERVATIONS STRUCTURALES AU MEB

1° *Traitement habituel* : Après une acétolyse et un traitement par les ultrasons dans des conditions semblables à celles du genre précédent (cuve émettrice, 40 kc/s, 1 h), aucune cassure n'a pratiquement pu être observée.

1. Les amincissements latéraux méridiens de l'endexine du genre *Brexia* s'estompent dans la zone subpolaire (HIDEUX, 1972 b, c) contrairement à ceux du genre *Ixerba* qui sont réunis dans la zone subpolaire.

2. *Carpenteria californica*, sous-famille des Hydrangéoidées, tribu des Philadelphées, Californie. Matériel pollinique prélevé grâce à l'obligeance du Dr QUIBELL : C.F. Quibell 852 (U.C.).



Pl. 2. — *Carpentaria californica* Torr. — 2, 3, 6, simple traitement physico-chimique (acétolyse + ultrasons, sonde émettrice à 20 kc/s); 1, 4, 5, 7-12, coupes transversales et longitudinales de grains de pollen acétolysés, après inclusion dans la solution de gomme arabique glycérine (10 μ m d'épaisseur). — 1, 4, grains de pollen entiers, non atteints par la coupe, symétrique d'ordre 2 et 3, tectum partiel, réseau, ectoaperture-sillon meridien (cas de syncolpie, 4); 2, 3, surface de rupture longitudinale au niveau de l'ectoaperture-sillon; 6, surface de rupture transversale; 7, 12, coupes transversales perpendiculaires à l'axe P et aux systèmes aperturaux, zone polaire ou subpolaire; 5, 8, 11, idem, zone intermédiaire; 9, idem, zone équatoriale ou subéquatoriale; 10, coupe longitudinale partielle; 5, coupe oblique. (Tous les clichés \times 3 000. — La réduction photographique, par rapport aux observations originales sur l'écran du M.E.B., est de 40 %. — Clichés des Laboratoires d'Écologie et de Géologie du Muséum).

Après une seconde acétolyse et un second traitement par les ultrasons, les cassures sont toujours rares; seuls quelques arrachements ou fractures longitudinales au niveau de l'ectoaperture-sillon sont observés. Cependant, après une acétolyse et un traitement par les ultrasons à l'aide d'une sonde émettrice¹ (20 kc/s, 15 min), l'obtention de cassures est plus importante comme le démontre le tableau 2 et la planche 2 (fig. 2, 3, 6).

TABLEAU 2. — OBSERVATIONS STRUCTURALES DU POLLEN DE *Carpenteria californica*. COMPARAISONS QUANTITATIVES PRÉLIMINAIRES EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE (M. ph.)

TECHNIQUE PHYSIQUE	NBRE TOTAL DE POLLENS OBSERV.	POURCENTAGE DE :					
		pollens entiers	arrachements ou de fragm.	coupes transversales	coupes longitudinales	double coupes	pollens déformés
Coupes de 10 µm après inclusion dans gomme-arabique-glycérine	81	6	36	27	17	2	12
Ultrasons, sonde émettrice 20 kc/s, 15 min	194	69	29	1,5	0,5	C	— cf. frag- ments

2° *Inclusion dans la gomme arabique-glycérine* : La diversité des coupes n'est pas comparable (tabl. 2) :

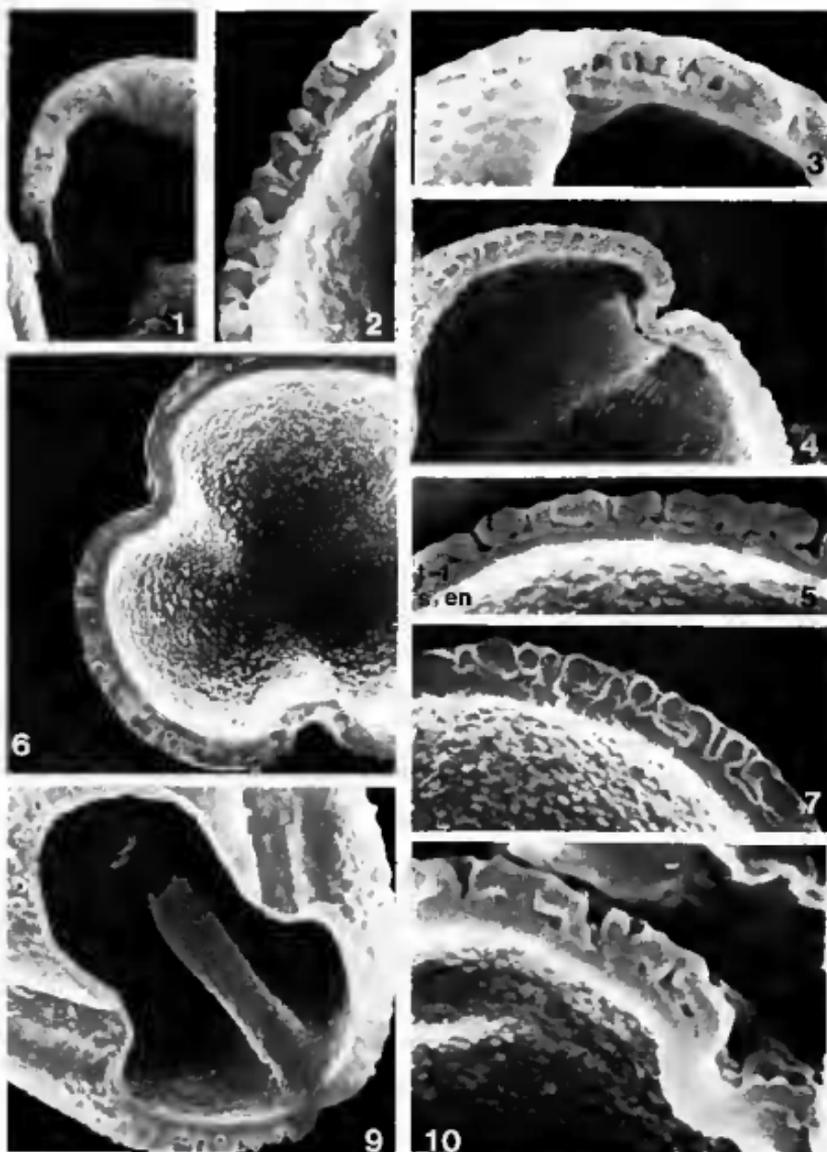
— coupes transversales, perpendiculaires ou subperpendiculaires par rapport à l'axe P, à des niveaux variés (zone polaire ou subpolaire, Pl. 2; fig. 7, 12. Zone intermédiaire, Pl. 2; fig. 5, 8, 11. Zone équatoriale ou subéquatoriale, Pl. 2; fig. 9);

— coupes longitudinales, plus ou moins parallèles à l'axe P, totales ou partielles (Pl. 2; fig. 10);

— coupes obliques (Pl. 2; fig. 5).

La plupart de ces coupes révèlent la surface interne de l'exine et des ouvertures et donnent une vision dynamique du système apertural : d'un grain de pollen à l'autre, le pli apertural est plus ou moins accentué et la forme de l'endoaperture très variable. Cet exemple est encore une illustration de l'importance de la mécanique aperturale en palynologie (VAN

1. Appareil provenant de la Société des Ultrasons d'Arnemasse, consistant en une sonde émettrice, type Sonimasse 250 T, vibrant à la fréquence de 20 kc/s.



Pl. 3. — *Carpentaria californica* Torr. — 1-3, simple traitement physico-chimique (acétolyse + ultrasons, sonde émettrice à 20 kc/s); 4-10, coupes de grain de pollen acétolysés, après inclusion dans la solution de gomme arabique-glycérine (10 μ m d'épaisseur). — 1 (\times 6 000), 3 (\times 12 000), surfaces réduites de rupture de l'exine; 2 (\times 12 000), idem, surface de rupture irrégulière accentuant sensiblement la profondeur de champ; 4, 6, 9 (\times 6 000); 10 (\times 12 000), coupes transversales du système apertural, surface interne de l'exine et détails du pli apertural; 5, 7, 10 (\times 12 000), coupes de l'exine, t : tectum, t' : columelles, s : sole, en : endexine, t/s + en \neq 1. (La réduction photographique, par rapport aux observations originales sur l'écran, est de 40 %. — Chêchès des Laboratoires d'Écologie et de Géologie du Muséum.)

CAMPO, 1961; HIDEUX, 1972 a, c) où des variations d'états d'un système sont constatées pour des grains de pollens d'une même population ayant subi les mêmes traitements physico-chimiques. La sensibilité du système apertural est donc très grande.

L'étude structurale de l'exine sur les coupes est particulièrement intéressante : les plans de coupe sont réguliers et généralement très importants (Pl. 3; fig. 4-10). Par contre, les surfaces de rupture obtenues par les ultrasons sont irrégulières et généralement réduites (Pl. 3; fig. 1-3). Cependant, l'irrégularité de la surface de rupture accroît très sensiblement la profondeur de champ des observations.

Le tectum partiel et les lumières du réseau, de formes et de dimensions variables d'une zone à l'autre du grain de pollen, sont observés sur les surfaces externes (Pl. 2; fig. 1, 2, 4) ou sur les surfaces de rupture ou de coupe (vision partielle, Pl. 2 et 3). Le tectum partiel (t), très épais, est interrompu, sur les coupes, par les lumières du réseau. Les columelles (t-1), massives, cylindriques, sont généralement courtes ($t/t-1 \neq 1$, Pl. 3; fig. 2, 3, 7) et quelquefois très réduites ($t/t-1 \gg 1$ Pl. 3; fig. 4, 7, 10). La sole n'est jamais différenciable de l'endexine (en) par ce mode d'observation. Les lumières du réseau sont réduites à des perforations ou totalement inexistantes dans les zones périaperturales où le tectum est complet.

La surface de l'ectoaperture est structurée (Pl. 2; fig. 1, 4, 10). Les coupes du système apertural (Pl. 3; fig. 4, 6, 10) permettent la mise en évidence du pli apertural et son interruption très caractéristique au niveau équatorial. L'épaisseur de l'ectexine est très réduite par l'ectoaperture; le tectum et les columelles sont les sous-couches les plus affectées par l'amincissement. Dans la zone périaperturale (Pl. 2; fig. 10), le tectum complet repose directement sur la sole. L'endoaperture, dont la forme est difficile à déterminer à cause des phénomènes de mécanique aperturale, est étroite et allongée équatorialement. Peut-être est-elle responsable de l'interruption équatoriale du pli apertural?

CONCLUSIONS

Cette technique simple est fondamentale pour l'étude des grains de pollen à exine résistante à la rupture et pour ceux, à exine fragile, collapsés dès le traitement chimique de fossilisation artificielle. Elle est à la fois une alternative et un complément de la technique de rupture de l'exine par les ultrasons qui demeure essentielle pour le nettoyage des surfaces polliniques et pour l'obtention des surfaces d'érosion de l'exine (CERCEAU, 1971; CERCEAU, ROLAND, 1972). En outre, la technique de rupture par les ultrasons semble constituer la suite la plus logique du traitement chimique de la fossilisation artificielle (acétolyse) lorsque des comparaisons doivent être effectuées, notamment en analyse pollinique, entre le pollen actuel et fossile. Les coupes, contrairement aux surfaces de rupture, sont obtenues indépendamment des caractéristiques physiques des grains de pollen. Enfin, comme les ultrasons, cette technique est simple : les opérations

d'inclusion, de solubilisation ne prolongent pas le temps de préparation du matériel pollinique, ce qui est fondamental pour l'utilisation du MEB, généralement destiné à de larges études comparatives, par exemple en palynologie.

D'une étude comparative des avantages et inconvénients de ces deux techniques appliquées aux observations structurales du pollen au MEB, il ressort que le choix éventuel de l'une ou de l'autre, ou que la part accordée à chacune, doit être fait en fonction des résultats désirés. Diversité et régularité des plans de coupe d'une part, obtention de surfaces de rupture d'autre part sont respectivement quelques-unes des caractéristiques prises en exemple de ces deux techniques.

REMERCIEMENTS. — Nous remercions tout particulièrement M^{me} CERCEAU, Maître de Recherches au C.N.R.S. qui nous a permis de réaliser cet article et aidé de ses précieux conseils en acceptant d'en revoir le manuscrit. Toute notre reconnaissance va également à M. les P^{rs} DELAMARE DEBOUTTEVILLE et LAFFITTE, à M. MASSOUD et M^{lle} NOËL qui nous ont facilité l'accès aux microscopes électroniques à balayage des Laboratoires d'Écologie générale et de Géologie du Muséum. Nous avons pu également bénéficier d'une collaboration technique très efficace de M. BOSSY, de M^{lle} DEROUET et de M^{lle} MUNSCH.

BIBLIOGRAPHIE

- CERCEAU, M.-T. — Morphologie pollinique et corrélations phylogénétiques chez les Umbellifères. In *The Biology and Chemistry of the Umbelliferae*, Heywood, V. H. (éd.), Acad. Press, Supplement 1 to *Botanical Journal of the Linnean Society*, **64** : 109-156 (1971).
- CERCEAU, M.-T., HIDEUX, M., MARCEAU, L. et ROLAND, F. — Cassure du pollen par les ultrasons pour l'étude structurale de l'exine au microscope électronique à balayage. *C. R. Acad. Sci. Paris* **270**, D : 66-69 (1970).
- CERCEAU, M.-T. et ROLAND, F. — Ultrastructure du pollen de *Daucus carota* L. en microscopie électronique à balayage et à transmission. *C. R. Acad. Sci. Paris* **275**, D : 2331-2333 (1972).
- HIDEUX, M. — A scanning electron microscope study of exine structure. In *Sporopollenin*, BROOKS, GRANT, MUIR et VAN GIJZEL (éd.), Acad. Press. : 440-445 (1971).
- Techniques d'étude du pollen au MEB : effets comparés des différents traitements physico-chimiques. *Micron* **3** : 1-31 (1972 a).
- Contribution palynologique à l'étude des Saxifragacées ligneuses australes : apport du MEB. Texte ronéotypé non publié, 300 p. (1972 b).
- Apport du microscope électronique à balayage à l'étude structurale de l'exine et des ouvertures de quelques Saxifragacées ligneuses. *Pollen et Spores*, **14**, 1 : 25-50 (1972 c).
- LEINS, P. — Eine einfache Methode zur Herstellung von schnitten durch azetolierte Pollenkörner. *Grana palynologica* **8** : 2-3 (1968).
- VAN CAMPO, M. — Mécanique aperturale, *Grana Palynologica* **2**, 3 : 93-97 (1961).

Muséum National d'Histoire Naturelle :
Laboratoire de Palynologie de l'E.P.H.E.
61, rue de Buffon, 75005 PARIS.
Laboratoire de Biologie Végétale Appliquée
et Laboratoire d'Écologie Générale.